

# HPLC-ELSD 法同时测定连翘叶中 齐墩果酸和熊果酸

赵韶华, 刘敏彦, 王玉峰, 许红辉, 张永锋, 王 猛  
(石家庄以岭药业股份有限公司, 河北 石家庄 050035)

**摘要:** 目的: 建立高效液相色谱-蒸发光散射检测法(high performance liquid chromatography -evaporative light scattering detector, HPLC-ELSD)法同时测定连翘叶中齐墩果酸和熊果酸。方法: 色谱柱: Waters Symmetry C<sub>18</sub>(4.6mm × 250mm, 5 μm); 柱温 25℃, 流动相: 甲醇-0.4% 冰醋酸溶液(93:7, V/V), 流速 0.4mL/min; 蒸发光散射检测器检测条件: 漂移管温度 80℃, 气体压力 25psi。结果: 齐墩果酸在 0.107~2.136 μg 范围内线性关系良好( $r=0.9991$ ), 熊果酸在 0.179~3.584 μg 范围内线性关系良好( $r=0.9993$ ); 齐墩果酸和熊果酸的回收率分别为 98.67% 和 98.56%。结论: 此方法简便、准确, 重现性良好, 为评价连翘叶的质量提供可靠的分析方法。

**关键词:** 连翘叶; 高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD); 齐墩果酸; 熊果酸

## Simultaneous Determination of Oleanolic Acid and Ursolic Acid in the Leaves of *Forsythia suspensa* by HPLC-ELSD

ZHAO Shao-hua, LIU Min-yan, WANG Yu-feng, XU Hong-hui, ZHANG Yong-feng, WANG Meng  
(Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Co. Ltd., Shijiazhuang 050035, China)

**Abstract:** Objective: To establish an high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD) method for the simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid in the leaves of *Forsythia suspensa*. Methods: The chromatographic separation was carried out on a Waters Symmetry C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase composed of methanol and 0.4% acetic acid (93:7, V/V) at a flow rate of 0.4 mL/min. An evaporative light scattering detector was used to detect oleanolic acid and ursolic acid with a drift tube temperature of 80 °C and a gas pressure of 25 psi. Results: Both the developed calibration curves of oleanolic acid and ursolic acid revealed a good linear relationship over the ranges of 0.107—2.136 μg ( $r=0.9991$ ) and 0.179—3.584 μg ( $r=0.9993$ ), respectively. The recovery rates of oleanolic acid and ursolic acid were 98.67% and 98.56%, respectively. Conclusion: A simple, accurate and credible HPLC-ELSD method has been developed, which is suitable for the quality control of the leaves of *Forsythia suspensa*.

**Key words:** leaves of *Forsythia suspensa*; high performance liquid chromatography -evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD); oleanolic acid; ursolic acid

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)02-0224-03

连翘为木犀科植物连翘 [*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl] 的干燥果实, 具有清热解毒, 消痈散结, 疏散风热的功效<sup>[1]</sup>。连翘中主要含有木脂素类、黄酮类、苯乙醇及其苷类、C<sub>6</sub>~C<sub>2</sub>天然醇、三萜类、单萜类等化学成分<sup>[2]</sup>。连翘叶是连翘植物的干燥叶, 具有与连翘相同的化学成分, 并且有些成分含量还高于连翘, 如木脂素、咖啡糖酰苷<sup>[3]</sup>。在我国河北、河南、山西、陕西等地, 民间常采集连翘嫩叶, 经加工制作成保健茶饮, 有较好的保健价值。现代药理研究发现, 连翘

叶提取物有抗菌、降脂保肝、抗氧化、抗衰老、抗疲劳等作用<sup>[4-10]</sup>。文献[11-13]对连翘叶中苷类成分的提取工艺, 不同采收期连翘叶中连翘苷、连翘酯苷和芦丁的含量, 以及连翘叶的干燥方法已有报道, 但对连翘叶中齐墩果酸和熊果酸的研究未见报道。齐墩果酸和熊果酸为五环三萜类化合物, 齐墩果酸具有保肝、解肝毒作用, 对四氯化碳诱导的肝损伤有保护作用, 可明显降低谷丙转氨酶和谷草转氨酶的活性<sup>[14]</sup>; 熊果酸具有免疫调节作用及较好的抗肿瘤活性, 对肿瘤形成各阶段

收稿日期: 2011-01-12

基金项目: 国家科技重大专项(2009ZX09313-003)

作者简介: 赵韶华(1966—), 男, 高级工程师, 主要从事中药新制剂的开发与应用研究。E-mail: zhaoshaohua66@163.com

都有预防和抑制作用<sup>[15-16]</sup>。为了开发利用连翘叶这一天然资源, 本实验采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法(high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector, HPLC-ELSD)法对连翘叶中齐墩果酸和熊果酸含量进行测定, 为有效控制连翘叶的质量提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

连翘叶, 河北井径县采集, 经河北省药品检验所孙宝惠鉴定。

齐墩果酸对照品(批号: 110709-200505)、熊果酸对照品(批号: 110742-200517) 中国食品药品检定研究院; 甲醇(色谱纯) 美国 Fisher 公司; 水为双蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

2695 Separations Module 高效液相色谱仪[配有 Waters 2424 型蒸发光散射检测器] 美国 Waters 公司; KQ-250B 超声波清洗器(250W) 昆山市超声仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 色谱条件

色谱柱: Waters Symmetry C<sub>18</sub>(4.6mm × 250mm, 5 μm); 柱温: 25℃, 流动相: 甲醇-0.4% 冰醋酸溶液(93:7, V/V), 流速: 0.4mL/min; 蒸发光散射检测器检测条件: 漂移管温度 80℃, 气体压力 25psi。齐墩果酸和熊果酸达到良好的分离。理论板数熊果酸和齐墩果酸峰均不得低于 5000。

#### 1.3.2 供试品溶液的制备

取连翘叶于 60℃ 干燥 8h, 粉碎成细粉, 取约 0.5g, 精密称定, 置 50 mL 具塞三角瓶中, 精密加入甲醇 25mL, 密塞, 称质量, 超声提取 40min(功率 250W, 频率 40kHz), 放冷, 称量, 用甲醇补足减失的质量, 过滤, 取续滤液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

#### 1.3.3 对照品溶液的制备

精密称取齐墩果酸对照品和熊果酸对照品适量, 置 50mL 量瓶中, 加无水乙醇制成每 1mL 约含齐墩果酸 0.11mg 和熊果酸 0.18mg 的溶液, 即得。

## 2 结果与分析

### 2.1 线性关系考察

精密吸取齐墩果酸和熊果酸对照品溶液 1、2、5、10、15、20 μL, 注入高效液相色谱仪中, 进行测定。以进样量的自然对数为横坐标、峰面积积分值的自然对数为纵坐标, 绘制标准曲线。结果表明, 齐墩果酸在 0.107~2.136 μg 范围内呈良好线性关系, 其进样量与峰面积积分值自然对数回归方程为  $\ln y = 1.669 \ln x + 15.591$ ,

$r = 0.9991$ 。熊果酸在 0.179~3.584 μg 范围内呈良好线性关系, 其进样量与峰面积积分值自然对数回归方程为:  $\ln y = 1.660 \ln x + 15.651$ ,  $r = 0.9993$ 。

### 2.2 精密度实验和稳定性实验

精密吸取齐墩果酸和熊果酸对照品溶液 10 μL, 分别连续进样 5 次, 测定峰面积, 结果齐墩果酸峰面积的 RSD 为 2.43%, 熊果酸峰面积的 RSD 为 2.69%, 表明仪器精密度良好。

精密吸取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12h 进样测定峰面积, 结果在测定的 12h 内, 齐墩果酸峰面积 RSD 为 2.56%, 熊果酸峰面积 RSD 为 2.79%, 表明供试品溶液在 12h 内基本稳定。

### 2.3 重现性实验

分别取同一份连翘叶样品高、中、低 3 个剂量(0.3、0.5、0.7), 每个剂量 3 份, 按供试品溶液的制备方法, 分别进行超声提取, 过滤, 各精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪测定, 结果齐墩果酸的 RSD 为 2.32%, 熊果酸的 RSD 为 2.58%, 表明方法的重现性良好。

### 2.4 回收率实验

采用加样回收实验方法, 取同一连翘叶样品, 9 份, 分别加入低、中、高 3 个水平的齐墩果酸对照品和熊果酸对照品溶液, 按供试品溶液的制备方法, 分别进行超声提取, 过滤, 各精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪测定, 计算回收率。齐墩果酸的平均回收率为 98.67% ( $n=9$ ), RSD 为 2.21%, 熊果酸的平均回收率为 98.56% ( $n=9$ ), RSD 为 1.64%, 说明方法准确度良好。结果见表 1、2。

表 1 齐墩果酸回收率实验测定结果

Table 1 Recovery rates of oleanolic acid from spiked samples

序号	取样量/g	对照品加入量/mg	样品中含齐墩果酸的量/mg	总测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD%
1	0.2515	0.6810	1.1055	1.7647	96.80		
2	0.2523	0.6810	1.1090	1.7765	98.02		
3	0.2556	0.6810	1.1236	1.7958	98.71		
4	0.2496	1.1350	1.0972	2.2168	98.64		
5	0.2585	1.1350	1.1363	2.2476	97.91	98.67	2.21
6	0.2467	1.1350	1.0844	2.2542	103.1		
7	0.2465	1.5890	1.0836	2.6235	96.91		
8	0.2526	1.5890	1.1104	2.6464	96.66		
9	0.2486	1.5890	1.0928	2.7024	101.3		

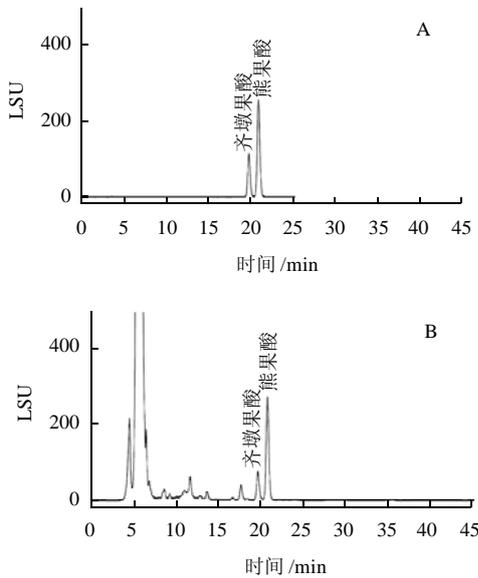
表 2 熊果酸回收率实验测定结果

Table 2 Recovery rates of ursolic acid from spiked samples

序号	取样量/g	对照品加入量/mg	样品中含熊果酸的量/mg	总测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD%
1	0.2515	1.3896	2.3008	3.6675	98.35		
2	0.2523	1.3896	2.3081	3.7023	100.3		
3	0.2556	1.3896	2.3383	3.6749	96.19		
4	0.2496	2.3160	2.2834	4.5834	99.31		
5	0.2585	2.3160	2.3649	4.6034	96.65	98.56	1.64
6	0.2467	2.3160	2.2569	4.6011	101.2		
7	0.2465	3.2424	2.2551	5.4563	98.73		
8	0.2526	3.2424	2.3109	5.4832	97.84		
9	0.2486	3.2424	2.2743	5.4645	98.39		

## 2.5 样品测定

取不同批次的连翘叶样品,按供试品溶液的制备方法进行超声提取,过滤,各精密吸取 10  $\mu$ L 注入液相色谱仪测定,记录色谱图(图 1),计算齐墩果酸和熊果酸的含量,结果见表 3。



A. 混合对照品溶液; B. 连翘叶样品。

图 1 混合对照品溶液和连翘叶样品色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of mixed standards and extract from *Forsythia suspense* leaves

表 3 连翘叶样品测定结果

Table 3 Results of determination of samples of *Forsythia suspense* leaves

样品	采集时间	齐墩果酸含量/(mg/g)	熊果酸含量/(mg/g)
1	2010.6.3	4.3957	9.1484
2	2010.6.11	4.4483	9.7260
3	2010.6.27	4.2957	8.9378

## 3 讨 论

供试品溶液的制备方法,常采用回流提取和超声提取的方法。本实验采用甲醇为提取溶剂,对回流提取时间和超声提取时间分别进行考察,结果显示超声提取 40min 提取率最高,回收率实验结果表明此方法准确度较好。齐墩果酸和熊果酸均为五环三萜类化合物,两者性质相似,不易分离,因此对流动相进行选择,采用甲醇-乙腈-0.5%冰醋酸溶液、甲醇-0.4%冰醋酸溶液、

甲醇-0.1%磷酸溶液体系进行对比实验,选择了以甲醇-0.4%冰醋酸溶液作为流动相,通过调整比例和流速,最终选择甲醇-0.4%冰醋酸溶液(93:7, V/V)作为流动相,流速 0.4mL/min,使齐墩果酸和熊果酸达到基线分离。

另外,课题组也曾对连翘果实中齐墩果酸和熊果酸的含量进行过研究,结果发现连翘果实中齐墩果酸和熊果酸的含量与叶中正好相反,在连翘叶中熊果酸的含量高于齐墩果酸的含量,而连翘果实中齐墩果酸的含量则高于熊果酸的含量。引起这种差异原因可能是由于药用部位的不同,也可能是由于实验样品采集的并非同一株植物上而造成的,其真正的原因还有待进一步研究。齐墩果酸保肝作用较显著,而熊果酸抗癌活性较强,研究连翘果实和叶中齐墩果酸和熊果酸含量的差别,可能为解释各自的药理作用,为临床用药提供科学的依据。

## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 159-160.
- [2] 李倩, 冯卫生. 连翘的化学成分研究进展[J]. 河南中医学院学报, 2005, 20(2): 78-80.
- [3] 丁冈, 刘延泽. 中药连翘及其同属植物的研究近况[J]. 中药材, 1994, 17(10): 42-44.
- [4] 段飞, 张双民, 杨建雄, 等. 连翘叶提取物抑菌作用的研究[J]. 西北药学杂志, 2005, 20(2): 66-67.
- [5] 侯改霞, 杨建雄. 连翘叶提取物对实验性小鼠的降脂保肝作用研究[J]. 河南大学学报: 自然科学版, 2010, 40(5): 504-506.
- [6] 杨建雄, 刘静. 连翘叶茶保肝作用的实验研究[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2005, 33(3): 82-85.
- [7] 杨建雄, 朱淑云, 李发荣. 连翘叶茶的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2002, 23(12): 120-123.
- [8] 杨建雄, 刘静, 李发荣, 等. 连翘叶茶抗氧化抗衰老作用的实验研究[J]. 营养学报, 2004, 26(1): 65-67.
- [9] 黄亚亚, 杨建雄, 赵咏梅. 连翘叶黄酮对力竭游泳恢复小鼠的抗疲劳作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(6): 1019-1022.
- [10] 柴渭莉, 杨建雄, 周俊芳, 等. 连翘叶苷类成分对力竭游泳小鼠心肌和骨骼肌超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量及超微结构的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2007, 26(5): 609-611.
- [11] 王娅丽, 杨建雄, 柴渭莉. 连翘叶中连翘苷类成分的提取工艺研究[J]. 西北药学杂志, 2006, 21(1): 9-10.
- [12] 张杲, 李发荣, 段飞, 等. 不同采收期连翘叶中连翘苷、连翘酯苷和芦丁的含量测定[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(6): 790-793.
- [13] 王秀文, 刘养清, 薛占成, 等. 连翘叶干燥方法的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(12): 41-42.
- [14] 田丽婷, 马龙, 堵年生. 齐墩果酸的药理作用研究概况[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(12): 884-887.
- [15] 冯英杰, 任会勋, 袁育康, 等. 熊果酸免疫调节作用的初步研究[J]. 西安交通大学学报, 2006, 27(6): 541-543.
- [16] 王春雷, 芦柏震, 侯桂兰. 熊果酸抗肿瘤作用研究进展[J]. 安徽医药, 2005, 9(10): 723-725.